



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS IPAMERI  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal



**POTENCIAL PATOGÊNICO E RECUPERAÇÃO DA  
ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pestalotiopsis  
microspora* DO EUCALIPTO APÓS LONGO PERÍODO DE  
ARMAZENAMENTO**

**LINCON RAFAEL DA SILVA**

**M  
E  
S  
T  
R  
A  
D  
O**

**Ipameri-GO  
2016**

LINCON RAFAEL DA SILVA

**POTENCIAL PATOGÊNICO E RECUPERAÇÃO DA  
ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pestalotiopsis microspora*  
APÓS LONGO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás – UEG, Câmpus Ipameri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de MESTRE.

Ipameri  
2016

Silva, Lincon Rafael da.

Potencial patogênico e recuperação da esporulação de isolados de *Pestalotiopsis microspora* do eucalipto após longo período de armazenamento - 2016.

37 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Ipameri, 2016.

Bibliografia.

1. Patogenicidade. 2. Crescimento micelial. 3. Armazenamento de fungos. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: “POTENCIAL PATOGÊNICO E RECUPERAÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pestalotiopsis microspora* DO EUCALIPTO APÓS LONGO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO”**

**AUTOR:** Lincon Rafael da Silva

**ORIENTADOR:** Daniel Diego Costa Carvalho

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL, pela comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANIEL DIEGO COSTA CARVALHO  
Universidade Estadual de Goiás/Câmpus Ipameri-GO



Profª. Dra. GLEINA COSTA SILVA ALVES  
Instituto Federal Goiano/Câmpus Urutai-GO



Prof. Dr. FLÁVIO GONÇALVES DE JESUS  
Universidade Estadual de Goiás/Câmpus Ipameri-GO

Data da realização: 01 de julho de 2016.

A todos os brasileiros, principalmente aos mais pobres e honestos que financiaram, por meio dos seus impostos, os meus estudos, e que, infelizmente, não puderam fazer o mesmo por seus descendentes.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, fiel companheiro, pela minha vida, saúde e todas conquistas alcançadas até hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho, pela imensa dedicação, paciência, companheirismo e conhecimentos passados.

Ao meu pai José Vieira “Zé Beth” e meus irmãos Wender, Renato, Getúlio e Renan, pelo incentivo e compreensão durante os meus estudos.

As minhas tias, Fátima e Ducha, pelo amor, carinho e companheirismo desde o falecimento da minha mãe.

Aos demais familiares.

À Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Ipameri, pela feliz oportunidade de realizar minha graduação e mestrado.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela bolsa de mestrado concedida para realização dos meus estudos.

Aos professores do curso e servidores do Câmpus, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos companheiros do Laboratório de Fitopatologia (LabFito), que apoiaram e contribuíram para execução deste trabalho.

Aos meus eternos amigos e companheiros de todas as horas, “Os Guerreirinhos”.

A todos os amigos que fizeram parte da minha caminhada até aqui.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância econômica do eucalipto .....	1
1.2 Caracterização botânica do eucalipto .....	2
1.3 Doenças como fatores limitantes da produtividade do eucalipto .....	2
1.4 O fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp. ....	5
1.5 Recuperação de patogenicidade e viabilidade de fungos armazenados .....	7
2 OBJETIVO .....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento .....	11
3.2 Re-isolamento .....	11
3.3 Avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento .....	12
3.4 Análises estatísticas .....	13
4 RESULTADOS .....	14
4.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento .....	14
4.2 Re-isolamento .....	16
4.3 Purificação e avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento .....	17
5 DISCUSSÃO .....	20
5.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento .....	20
5.2 Re-isolamento .....	22
5.3 Purificação e avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento .....	23
6 CONCLUSÕES .....	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26

## RESUMO

Os plantios de eucalipto podem ser atacados por vários patógenos, principalmente por fungos, dentre os quais, *Pestalotiopsis* sp. são considerados fungos de fácil disseminação, infectando os mais diversos hospedeiros botânicos. Para sua diagnose e estudo de seu comportamento *in vitro*, muitas vezes, é necessário o seu isolamento. Entretanto, muitos isolados de fitopatógenos, após longos períodos de armazenamento ou sucessivas repicagens, perdem seu potencial patogênico ou mesmo a capacidade de esporulação, necessitando o emprego de técnicas de recuperação, visando preservar a viabilidade do microrganismo pelo maior tempo possível. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial patogênico e metodologias de recuperação da esporulação de isolados de *P. microspora* que perderam a capacidade de esporulação após serem submetidos a um longo período de armazenamento. Os isolados de *P. microspora* foram mantidos por longo período de armazenamento (14 meses) em placas de Petri, a 10°C. Após este período, as colônias dos isolados passaram a apresentar reduzida capacidade de crescimento micelial e esporulação inexistente. Os isolados foram inoculados em folhas sadias de eucalipto e após dez dias foram submetidos a três metodologias de re-isolamento: raspagem das lesões (R), remoção de fragmentos de tecido vegetal lesionados, seguidos de desinfestação (D) e sem emprego de desinfestação (SD), para avaliação da técnica que proporcionasse melhor obtenção de colônias do fungo. Em seguida, os isolados purificados foram avaliados quanto a recuperação da capacidade de esporulação. Após os experimentos verificou-se no teste de patogenicidade que o isolado E-72-02 foi superior aos demais quanto a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); no re-isolamento, a metodologia sem desinfestação (SD) foi superior as demais (R e D) quanto a obtenção de micélio de *P. microspora*. Ao se avaliar a média de esporulação de cada isolado, quando submetido às três metodologias de recuperação, verificou-se que todos os isolados recuperaram a capacidade para esporular, sendo que o isolado E-72-03 foi superior aos demais. Ao final do emprego de diferentes técnicas de re-isolamento, a ocorrência de diferença entre os isolados evidenciou que a esporulação é uma característica isolado-dependente. As três técnicas avaliadas (R, SD e D) permitem a recuperação da esporulação de *P. microspora* após estes terem sido submetidos a longo período de armazenamento.

**Palavras-chave:** Patogenicidade, crescimento micelial, armazenamento de fungos.

## ABSTRACT

The eucalyptus crops can be attacked by several pathogens, mainly fungi, among which, *Pestalotiopsis* sp. it is known as easily spread fungi, infecting diverse botanical hosts. For their diagnosis and study of their in vitro behavior, often, its isolation is required. However, many plant pathogens isolates, after long periods of storage or successive cuttings lose their pathogenic potential or sporulation capacity, needing the use of recovery techniques, in order to preserve the viability of the microorganism as long as possible. The objective of this study was to evaluate the pathogenic potential and methodologies for recovery of the sporulation of *P. microspora* isolates that lost its sporulation capacity after subjected to a long storage period. Isolates of *P. microspora* were kept for a long storage period (14 months) in Petri dish at 10°C. After this period, the isolates colonies showed reduced mycelial growth and none sporulation. The isolates were inoculated on healthy eucalyptus leaves and after ten days, they were subjected to three reisolation methods: scraping of the lesions (S) removing of injured plant tissue fragments, followed by disinfestation (D) and without disinfestation (WD), aiming to evaluate the method that provide better fungal colonies growth. Just after, the purified isolates were evaluated for the recovery of its sporulation ability. After the experiments it was found in the pathogenicity assay that the isolated E-72-02 was higher than the others as the area under the disease progress curve (AUDPC); in reisolation, the methodology without disinfestation (WD) was higher than the others (S and D) as to *P. microspora* mycelium growth. When evaluating the individual sporulation average, when subjected to the three recovery methods, it was found that all isolates recovered the ability to sporulate, on wath the isolate E-72-03 was higher to the others. At the end of the use of different methods for reisolation, the occurrence of differences among the isolates showed that sporulation is a isolated-dependent feature. The three methods (S, WD and D) allow the sporulation rocovery of *P. microspora* after these isolates have been subjected to long storage period.

**Key-words:** Pathogenicity, mycelial growth, fungi storage.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Importância econômica do eucalipto

Com área ocupada de 7,74 milhões de hectares, o que corresponde a 0,9% do território nacional, o setor brasileiro de árvores plantadas é responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais. As espécies florestais são de grande importância para a economia porque oferecem uma ampla gama de produtos como a celulose, diversos tipos de papel, painéis de madeira, pisos laminados, painéis compensados, móveis, demais produtos sólidos de madeira, carvão vegetal e outras biomassas para fins energéticos (NEVES et al., 2013).

Entre todas as culturas exploradas no setor florestal, destaque deve ser dado a cultura do eucalipto, considerada a árvore mais plantada no mundo, com mais de 17 milhões de hectares. O Brasil é o segundo maior em área plantada, com mais de 5,5 milhões de hectares de eucalipto, o que representa 71,9% do total de árvores plantadas no país, sendo mais de 50% desta área ocupada pela espécie *Eucalyptus grandis* (ALFENAS et al., 2009; CAMPOS et al., 2011; AGUIAR, 2015).

Os principais estados brasileiros produtores de eucalipto são Minas Gerais (25,2%), São Paulo (17,6%) e Mato Grosso do Sul (14,5%), com produtividade média de 39 m<sup>3</sup>/ha/ano, com essa média, o Brasil em 2014, foi o quarto maior produtor de celulose no mundo, e como primeiro produtor mundial de celulose de eucalipto (AGUIAR, 2015).

A escolha do eucalipto para suprir o consumo de madeira, tanto em escala industrial como para pequenos consumidores, está relacionada a algumas vantagens da espécie, como rápido crescimento, grande diversidade de espécies, possibilitando a adaptação da cultura às diversas condições de clima e solo, facilidade de propagação, tanto por sementes, como por via vegetativa e possibilidade de utilização para os mais diversos fins (BERNADI et al., 2014).

Devido a gama de produtos obtidos com o eucalipto, ao longo dos anos os pesquisadores procuram identificar a melhor espécie para cada tipo de segmento da indústria. De acordo com o estudo feito por Angeli (2005), as espécies de eucalipto indicadas em função de cada segmento são: **para celulose:** *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. urophylla* (híbrido); **para lenha e carvão:** *E. camaldulensis*,

*E. citriodora*, *E. grandis* e *E. urophylla*; **para serraria:** *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*; **para móveis:** *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. tereticornis*; **para laminação:** *E. botryoides*, *E. dunnii*, *E. grandis* e *E. tereticornis*; **para caixotaria:** *E. dunnii*, *E. grandis*, *E. pilularis* e *E. resinífera*; **para construções:** *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. cloeziana* e *E. deglupta*; **para postes:** *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. tereticornis* e *E. resinífera*; **para estacas e mourões:** *E. citriodora*, *E. maculata* e *E. paniculata*; **para óleos essenciais:** *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. tereticornis*.

Dessa forma, com as informações citadas é possível afirmar a importância socioeconômica da cultura do eucalipto, pois, seu plantio, beneficiamento e comercialização têm participação efetiva no desenvolvimento dos setores da economia das regiões brasileiras.

## 1.2 Caracterização botânica do eucalipto

O eucalipto *Eucalyptus* sp. (Charles Louis L'Héritier de Brutelle, em 1788) é uma planta nativa da Austrália, pertence ao Reino Plantae, Família Myrtaceae, com cerca de 670 espécies e subespécies já identificadas, apresenta porte elevado, forte dominância apical, a casca pode ser parcialmente rugosa a espessa fibrosa, de coloração marrom, quando seca, e quase negra, quando úmida.

Em função da altitude, pode haver ocorrência de casca lisa. As folhas das plantas adultas são alongadas, estreitas e pecioladas. Os frutos podem apresentar formas de dois tipos: campanulado ou hemisférico, em altitudes superiores a 1000m; cônico, em altitudes inferiores a 1000 m (MARTIN e COSSALTER, 1976). Além disso, segundo Pryor (1978), as flores de todas as espécies são hermafroditas e têm, como principais vetores de polinização, os insetos. As espécies são preferencialmente alógamas, mas apresentam sistema reprodutivo misto, podendo ocorrer até 30% de autogamia.

## 1.3 Doenças como fatores limitantes da produtividade do eucalipto

Doenças em plantas são desordens fisiológicas ou anormalidades estruturais à planta ou para alguma de suas partes ou produtos. O estudo de doenças das plantas foi iniciado pelo médico alemão Anton Von De Bary, em 1943 e, desde então, a

Fitopatologia vem evoluindo e contribuindo para a redução de perdas de produtos oriundos de plantas (GONÇALVES, 2011), por isso, o conhecimento das doenças e de seus patógenos é fundamental para o sucesso dos produtores.

Os plantios de eucalipto podem ser atacados por vários patógenos, principalmente por fungos, que podem estar presentes em diferentes etapas do cultivo, no qual apresenta diferentes problemas sendo observados nas plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano, reduzindo em até 60% a produção de eucalipto no Brasil (SANTOS et al., 2001; ROYO, 2012). Nos últimos anos, as manchas foliares causadas por patógenos fúngicos têm assumido grande importância, sobretudo em plantios adultos de eucalipto (RODAS et al., 2005; LANA et al., 2012). Esse aspecto é muito relevante porque as manchas foliares diminuem a área fotossintética das folhas, reduzindo a absorção de energia luminosa e, por consequência, a diminuição no acúmulo de biomassa, o que acarretará na redução da produtividade (XAVIER et al., 2015).

O reino Fungi está entre os maiores componentes da árvore da vida e sua atual classificação inclui todos os microorganismos eucariontes, heterotróficos, que se nutrem por absorção, com desenvolvimento ramificado e se reproduzem por esporos (KRUSCHEWSKY, 2010). Dentre os problemas patológicos que podem ocorrer em espécies florestais, especificamente a cultura do eucalipto, às doenças causadas por fungos são as mais comuns e as mais importantes, as quais serão brevemente discutidas a seguir.

O Tombamento de Mudas “Damping-off”, tem sido relatado nas plantações de eucalipto por meio de diferentes patógenos: *Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* (SANTOS et al., 2001; ALFENAS et al., 2009). A importância da doença está limitada aos viveiros de pequenos produtores, nos quais a obtenção de mudas inicia-se em sementeiras ou canteiros com posterior repicagem das plântulas para tubetes ou outros tipos de recipientes. O sintoma típico da doença é a lesão na região do colo da plântula, a qual pode se estender a alturas variáveis no hipocótilo, com aspecto encharcado de início e depois coloração escura. A doença ocorre normalmente em reboleiras, especialmente em canteiros novos, semeados a lanço (KRUGNER e AUER, 2005).

Outra doença relatada no eucalipto é o Mofo Cinzento, sendo o agente causal o fungo *Botrytis cinerea*, um patógeno facultativo que vive saprofiticamente no solo e

sobrevive na forma de escleródios ou micélio dormente. Sua disseminação dá-se principalmente pelo transporte dos conídios pelo vento e por insetos (FURTADO et al., 2001). Os sintomas iniciam-se por um enrolamento, seguido de seca das folhas. Comumente aparece cobrindo as partes afetadas, um crescimento acinzentado formado por conidióforos e massa de conídios do fungo (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2005; KRUGNER e AUER, 2005).

A doença conhecida como Canela Preta causada pelos fungos *Cylindrocladium candelabrum* e/ou *Cylindrocladium ilicicola*, geralmente é encontrada em plantios jovens de eucalipto, provavelmente resultante de infecções iniciadas no viveiro. A doença se caracteriza pela formação de lesões necróticas escuras, muitas vezes deprimidas, nos tecidos do caule das mudas. Os tecidos doentes mostram inicialmente uma coloração castanho-avermelhado passando a castanho escuro (FERREIRA et al., 2006; POLIZZI et al., 2011).

Atenção tem sido dada também a Doença Rosada, cujo o agente causal é o fungo *Erythricium salmonicolor*. Apesar de acarretar altos índices de mortalidade e danos variados em outros países como Costa Rica e Zaire, raramente causa danos sérios no Brasil. Os sintomas iniciais aparecem na forma de pústula, de coloração rosada, sobre a superfície de ramos e do tronco. A partir destas pústulas desenvolve-se um micélio de mesma cor que circunda as partes atacadas. Os tecidos morrem e as folhas ligadas às áreas afetadas amarelecem e secam. Isso pode deformar as árvores e afetar seu crescimento (GEZAHGNE, et al., 2003; PLOETZ, 2003).

A Ferrugem do eucalipto tem ampla distribuição geográfica e é causada pelo fungo *Puccinia psidii*, afetando diversas espécies de mirtáceas nativas cultivadas. Os danos podem ser consideráveis, dependendo do local, manejo silvicultural e das espécies (CARNEGIE e LIDBETTER 2012). Os sintomas ocorrem inicialmente nos tecidos jovens das folhas e caule ainda em desenvolvimento. Começam por pontuações cloróticas que se transformam em pústulas, onde se expõem, com o rompimento da epiderme, com surgimento de massas pulverulentas de urediniosporos, de coloração amarelo-ouro. Em consequência, os tecidos afetados morrem e secam, adquirindo coloração negra, como se fossem queimados. Árvores altamente suscetíveis podem ter seu crescimento comprometido pela doença, sofrendo um enfezamento quando severamente atacadas (KRUGNER e AUER, 2005).

Por fim, outra doença registrada em várias regiões brasileiras é o Oídio, causada pelo fungo *Oidium* sp. que pode infectar várias espécies de eucalipto, em viveiros, casa de vegetação e campo. Brotações e gemas são preferencialmente atacada e, quando não morrem, dão origem a folha de limbo enrugado, afilado e geralmente com uma metade mais estreita do que a outra. No campo, o sintoma toma maior importância pela perda da dominância apical, comprometendo a formação de um fuste reto para produção de postes e mourões. Recobrando as partes afetadas, ocorre, com frequência, crescimento esbranquiçado, pulverulento, constituído por micélio e estruturas reprodutivas do fungo, típico dos oídios (STADNIK e RIVERA, 2001).

#### **1.4 O fungo *Pestalotiopsis* sp.**

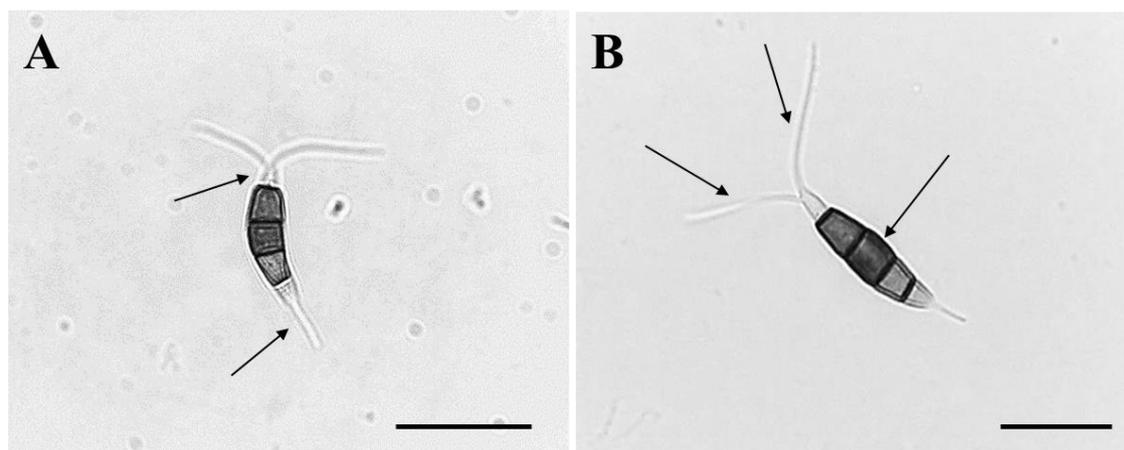
A mancha de *Pestalotiopsis* tem ganhado importância nos últimos anos, em muitas culturas florestais e frutíferas. Assim, nos plantios de eucalipto, especial atenção tem sido dada ao gênero *Pestalotiopsis* Steyaert (1949), onde nota-se o anamorfo de *Pestalosphaeria* M.E. Barr (1975). *Pestalotiopsis* sp., pertence ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Coelomycetes; Ordem Xylariales e a família Amphisphaeriaceae e estão amplamente distribuídos pelo mundo, ocorrendo em solos, ramos, sementes, frutos e folhas, podendo ser parasitas, endofíticos ou sapróbios, existindo aproximadamente 234 espécies descritas (SMITH et al., 2003; JEEWON et al., 2004).

Seu micélio é imerso, ramificado, septado, hialino a marrom claro; os conidiomas são do tipo acervular e possuem uma parede basal bem desenvolvida, formada por células angulares, delgadas; os conidióforos hialinos são ramificados e septados, cilíndricos formados a partir de células terminais do pseudoparênquima acervular (SUTTON, 1980).

Os esporos são as principais estruturas de disseminação deste grupo de fungos, com várias formas e cores, originados apenas por mitose e com produção contínua de reprodução, são formados em acérvulos e apresentam quatro septos transversais com três seções intermediárias pigmentadas e as duas células das extremidades são hialinas (Figura 1). Na extremidade apical do conídio estão presentes dois ou três apêndices filiformes e os conidióforos são curtos e simples (LAZAROTTO et al., 2014).

No entanto, o gênero *Pestalotiopsis* é complexo e pode ser difícil de classificar ao nível de espécie, porque características como estrutura de frutificação, comprimento

e morfologia dos conídios, tendem a variar dentro das espécies e também com qualquer mudança no ambiente (KARAKAYA, 2001). Além disso, segundo El-Argawy (2015), algumas espécies também foram identificadas com base na ocorrência no hospedeiro em questão. Desta forma, Nag Rag (1993), sugeriu a utilização do tamanho do conídio e dos apêndices para distinção entre as espécies.



**Figura 1.** Conídios de *Pestalotiopsis microspora* pertencente a coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Ipameri. Os conídios representados, com cinco células, sendo as duas células apicais hialianas e as outras três células intermediárias pigmentadas e, contendo dois apêndices apicais e um apêndice basal. (A) setas mostram a célula apical hialiana do conídio e o apêndice basal hialiano. (B) setas indicam os dois apêndices apicais hialianos do conídio e a célula mediana pigmentada. Barras correspondem a: 20  $\mu\text{m}$  e 16  $\mu\text{m}$  para as figuras 1A e 1B, respectivamente.

As espécies patogênicas deste gênero entram em contato com o hospedeiro, inicialmente por meio do inóculo primário, através da penetração de seus conídios. Os inóculos são muito resistentes e podem sobreviver as mais diferentes condições climáticas (ESPINOZA e BRICEÑO, 2008). De acordo com Keith et al., (2006), o inóculo primário pode ser plantas nativas ou voluntárias, ou ainda em flores, restos culturais, solo, ferramentas contaminadas e água de irrigação (ELLIOT et al., 2004).

Frequentes associações endofíticas têm sido descritas para *Pestalotiopsis*, sendo estas, comumente encontradas em regiões subtropicais e tropicais (WEI et al., 2007; STROBEL et al., 2003). Estudos recentes mostram este patógeno associado ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em manchas foliares em plantas de *E. grandis*, e como

patógeno secundário em tecido lenhoso de *E.viminalis* (CARMO et al., 2013). Além disso, Alonso et al., (2009) relata em seu estudo lesões na casca de plantas de *E. globulus* e Kharwar (2010) como um fungo endofítico (habitam o interior do vegetal) e epifítico (habitam a superfície vegetal) em folhas de *E. citriodora*.

De maneira geral há relatos deste patógeno em uma grande diversidade de hospedeiros por todo o mundo, causando danos com diferentes sintomas em espécies ornamentais, coníferas e frutíferas (ROSA e CAVALCANTI, 2005; GONTHIER et al., 2006; JOSHI et al., 2009). O grande número de relatos na literatura do gênero *Pestalotiopsis* sp. causando danos aos vegetais se deve porque os seus esporos são de fácil disseminação no meio ambiente e penetram nos tecidos vegetais por ferimentos ou aberturas naturais, infectando os mais diversos hospedeiros botânicos, principalmente o eucalipto (CARMO et al., 2013).

### **1.5 Recuperação de patogenicidade e viabilidade de fungos armazenados**

A partir do século XIX a microbiologia apresentou notável desenvolvimento devido ao reconhecimento, pelo homem, da grande importância dos fungos, por este motivo, com o objetivo de isolar, cultivar e preservar tais microrganismos, inúmeras técnicas de manutenção passaram a ser desenvolvidas e aprimoradas (PASSADOR et al., 2010).

A preservação de culturas de microrganismos é um processo complexo em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem a respeito das reações e modificações morfofisiológicas que ocorrem nos microrganismos em condições de armazenamento e quando dessa preservação ou mesmo o tempo de preservação diminui o poder patogênico destes (GIRÃO et al., 2004). Desta forma, estes obstáculos têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas, sobretudo, pela importância de algumas espécies.

Devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras, muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação, com a adoção de protocolos próprios e avançadas tecnologias no controle de dados (PAOLI, 2005).

Cada patógeno possui sua especificidade em relação a fatores ambientais como água, ar e temperatura que podem afetar seu desenvolvimento e dispersão de seus

propágulos para posterior infecção. Estudos com o objetivo de interromper ou pelo menos retardar o relógio biológico de microrganismos têm sido realizados desde os tempos mais remotos, tendo alcançado um potencial significativo de estocagem de amostras de microrganismos a curto, médio e longo prazo (SOLA et al., 2012). Dessa forma, os estudos sobre a variabilidade e manutenção dos fungos são interessantes porque auxiliam na compreensão de sua patogenicidade aos vegetais (LAZAROTTO et al., 2014).

O objetivo da preservação de isolados não é somente conservar o estado inicial do fungo evitando mutações indesejáveis, mas também alcançar a máxima preservação da quantidade e vitalidade das células que possuam capacidade de esporular e serem patogênicas as plantas. Para tanto a preservação não deve alterar os componentes da parede celular nem a virulência do fungo (GIRÃO et al., 2004; COSTA et al. 2009).

Protocolos experimentais de armazenamento de culturas fúngicas têm estabelecido que a viabilidade aceitável para fungos seja a germinação e desenvolvimento das células a uma taxa acima de 75% (PASSADOR et al., 2010). Isso se deve porque a implantação e manutenção de coleções de culturas fúngicas subsidiam a formação de estoques de cepas, as quais podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (PAOLI et al., 2005; SOLA et al., 2012).

Mesmo que mantidos em condições viáveis de armazenamento, após sucessivas repicagens, isolados de fungos podem perder o poder de esporulação ou mesmo a virulência (ALVES, 1998; ALVES e FARIA, 2010). Contudo, é necessário buscar metodologias de recuperação da esporulação desses fungos, pois, isto implicará na não necessidade de se trabalhar com plantas hospedeiras, não necessitando de obtenção de novos isolados de fungos, em decorrência da perda da viabilidade dos isolados mantidos (BUENO, et al., 2004).

O hipoclorito de sódio e o álcool etílico são desinfetantes largamente utilizados em trabalhos de preservação e viabilidade de fungos. A concentração dos agentes desinfetantes e o tempo de exposição dos materiais estudados a esses agentes pode variar de acordo com a espécie, sendo necessário, então, a sua adequação de acordo com a sensibilidade do alvo a ser desinfestado (NASCIMENTO et al., 2007). No reisolamento de fungos fitopatogênicos (conclusão dos postulados de Koch), o uso dessas substâncias desinfestadoras podem ser benéficas, pois existe uma diversidade de fungos

endofíticos que habitam os vegetais, estes podem aumentar a resistência do hospedeiro ao ataque dos fungos fitopatogênicos, dificultando possíveis estudos de inoculação e recuperação da viabilidade de fungos armazenados (PIMENTEL et al., 2006).

Finalmente, a recuperação da esporulação de fungos significa assegurar um patrimônio de culturas e bancos genéticos que poderão ser utilizados em uma eventual necessidade de patogenia e infectividade em hospedeiros pelo mundo, afim de novos estudos sobre o patógeno ou doença em questão, além de ser recurso científico necessário para a atividade laboratorial, diagnóstica e de pesquisa, além disso, observa-se a grande importância no estudo das diferentes técnicas de preservação e recuperação da esporulação de culturas fúngicas em laboratório, o que poderá possibilitar considerável avanço nos conhecimentos relativos à biologia dos fitopatógenos.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial patogênico e metodologias de recuperação da esporulação de isolados de *P. microspora* que perderam tal capacidade após serem submetidos a um longo período de armazenamento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento

Os isolados E-72-02, E-72-03, E-72-04 e E-72-06 de *P. microspora* foram mantidos por longo período de armazenamento (14 meses: setembro de 2013 a janeiro de 2015) em placas de Petri, a 10°C. Após este período, as colônias dos isolados, que antes possuíam boas taxas de crescimento micelial e de esporulação (MARQUES et al., 2015), passaram a apresentar reduzida capacidade de crescimento e esporulação inexistente. Assim, os isolados foram inoculados em folhas sadias de *E. grandis* ‘GG 100’ com idade variando entre 18 a 24 meses.

Para esta etapa, as folhas coletadas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar em câmara de fluxo laminar, por 10 min. Em seguida, foram realizados cinco furos no centro do limbo foliar com auxílio de uma agulha de platina e depositado um disco de ágar (5 mm Ø) contendo micélio de cada isolado. As folhas inoculadas foram submetidas a condições controladas de câmara úmida em caixas acrílicas transparentes do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), contendo uma folha de papel germiteste com manutenção de umidade constante apenas no papel (6 folhas de *E. grandis* por isolado; uma folha de *E. grandis* por gerbox). Em seguida, foram realizadas medições das lesões na face abaxial das folhas aos 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação (DAI), com o auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se o tamanho das lesões em mm<sup>2</sup>, utilizando o cálculo da área da circunferência ( $A = \pi.r^2$ ).

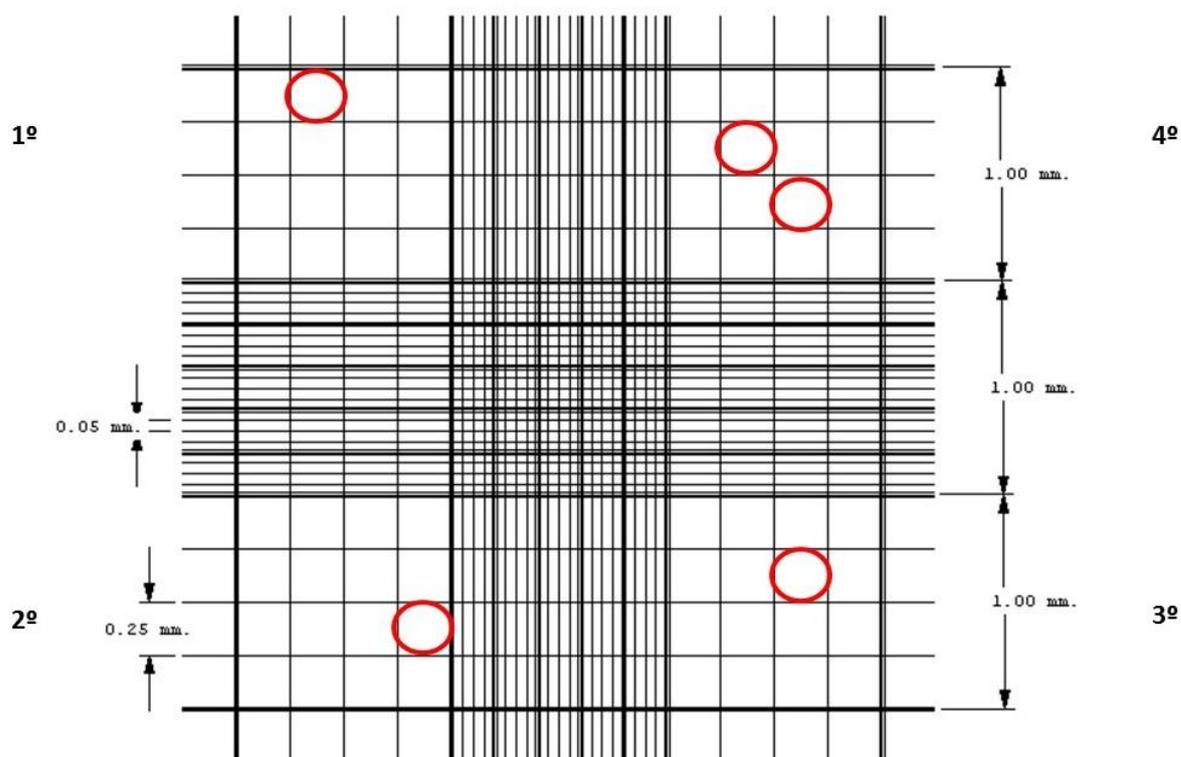
#### 3.2 Re-isolamento

Após desenvolvimento das lesões nas folhas, estas foram removidas para re-isolamento do patógeno mediante emprego de três metodologias: (1) raspagem de estruturas do fungo contidas sobre o tecido vegetal lesionado com agulha de platina e, subsequente repicagem para placas de Petri, contendo meio batata dextrose ágar (BDA) (R); (2) remoção de fragmentos de tecido vegetal lesionado, adicionados da submissão destes a uma série de desinfestação [(a) imersão dos fragmentos em etanol 70% (60 s), (b) subsequente imersão em hipoclorito de sódio 2% (60 s) e (c) lavagem em água destilada esterilizada (ADE), por três vezes, de 60 segundos cada] (D); (3) remoção de

fragmentos de tecido vegetal lesionado sem desinfestação (SD) Os fragmentos obtidos conforme as metodologias SD (sem desinfestação) e D (com desinfestação) foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA (1 fragmento de 5 mm<sup>2</sup> placa<sup>-1</sup>). Empregou-se seis placas de Petri para cada isolado de *P. microspora*, em cada uma das metodologias de re-isolamento (R, D e SD) avaliadas. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas em BOD a 25°C com ausência de luz, para avaliação do crescimento micelial a partir do 4º dia de incubação (baseada na média de duas medidas diametralmente opostas) e eliminação e eventuais placas contaminadas.

### **3.3 Avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento**

Após o re-isolamento, os isolados obtidos de cada uma das três metodologias empregadas (R, D e SD) foram submetidos a repicagens sucessivas até purificação. Em seguida, os isolados purificados foram avaliados quanto a esporulação, com vistas a verificar se esta capacidade foi recuperada, empregando-se seis placas de Petri por isolado. Após 10 dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h, um total de 10 mL de ADE (Água Destilada Esterilizada) foram adicionados em cada placa de Petri, seguido da liberação dos esporos com alça de Drigalsky. Em seguida, os esporos foram recolhidos em Becker e filtrados em gaze esterilizada. As concentrações das suspensões obtidas foram mensuradas em câmara de Neubauer (Figura 2), realizando-se a contagem de esporos em cinco quadrantes da câmara para cada placa (CARVALHO et al., 2008). O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC).



**Figura 2.** Esquema de um hemacitômetro tipo Neubauer, mostrando os quadrantes (compartimentos) e seus subcompartimentos (marcados com elipses de cor vermelha) onde foram realizadas as contagens de esporos, aleatoriamente, em cinco quadrantes da câmara para cada placa de Petri.

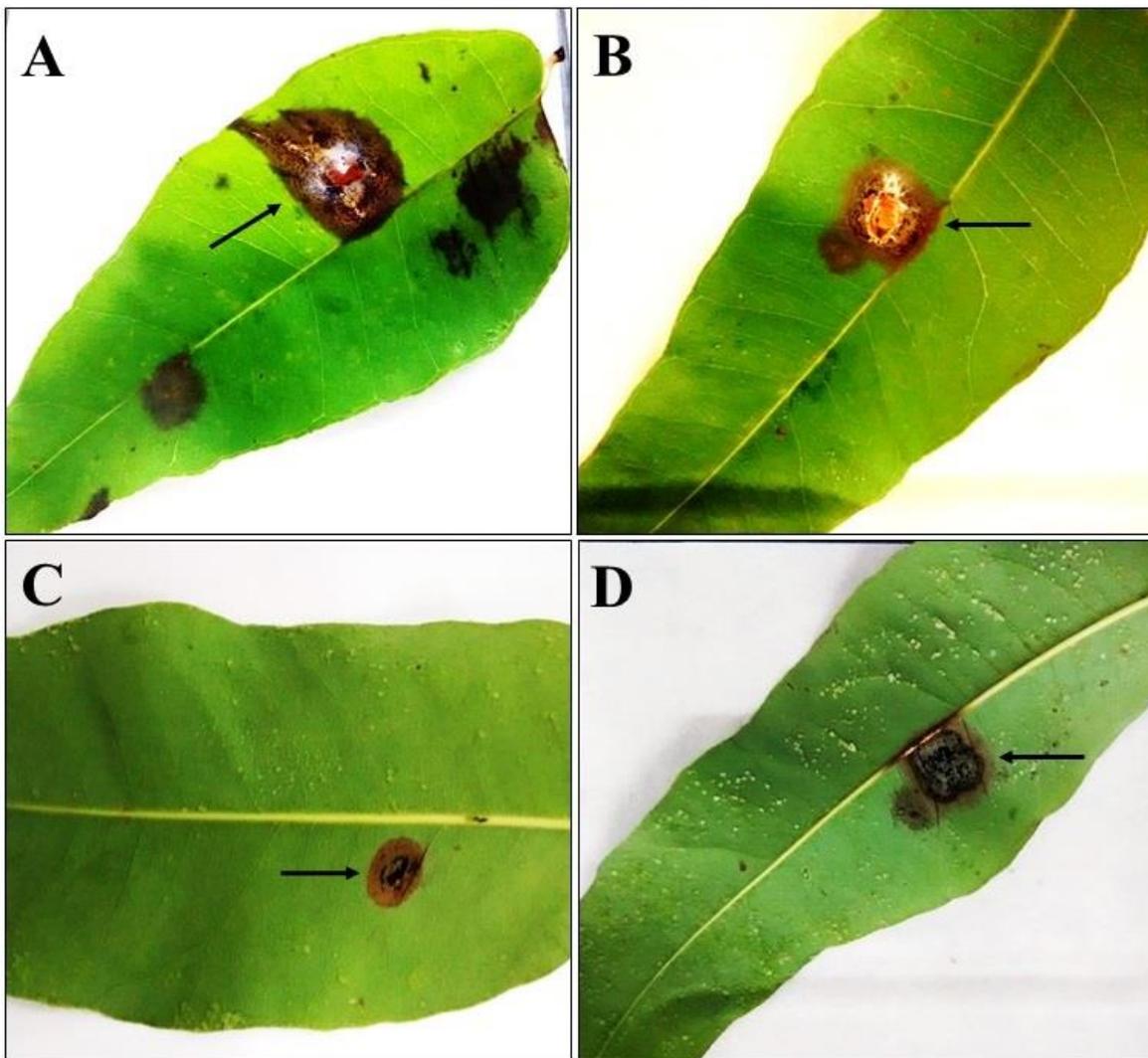
### 3.4 Análises estatísticas

Na avaliação do potencial patogênico e re-isolamento, os dados referentes às lesões causadas por *P. microspora* e crescimento micelial dos 4 aos 10 DAI, respectivamente, foram submetidos à análise de regressão para obtenção de modelos significativos. A severidade e crescimento micelial foram integralizados como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), respectivamente, através da fórmula  $AACPD/AACCM = \sum [(y1 + y2)/2] * (t2 - t1)$ , onde  $y1$  e  $y2$  são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos  $t1$  e  $t2$ , respectivamente (MILAN et al., 2015). Já a avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Em todas as análises foi empregado o programa estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento

Após as inoculações, foram reproduzidos os sintomas típicos da mancha de *Pestalotiopsis*, o qual se caracterizou por lesões necróticas de coloração marrom escura aos 10 DAI (Figura 3).



**Figura 3.** Folhas de *Eucalyptus grandis* cv. ‘GG100’ inoculadas com *Pestalotiopsis microspora*, aos 10 dias após a inoculação (DAI), exibindo os sintomas e lesões. (A) isolado E-72-02: seta mostra lesão necrótica marrom escura, típica do gênero *Pestalotiopsis*, contendo micélio do fungo desenvolvido sobre o tecido foliar necrosado; (B) isolado E-72-03: lesão necrótica marrom escura; (C) isolado E-72-04: lesão necrótica marrom escura; (D) isolado E-72-06: lesão necrótica marrom escura contendo aglutinações escuras correspondentes ao desenvolvimento de acérvulo do fungo.

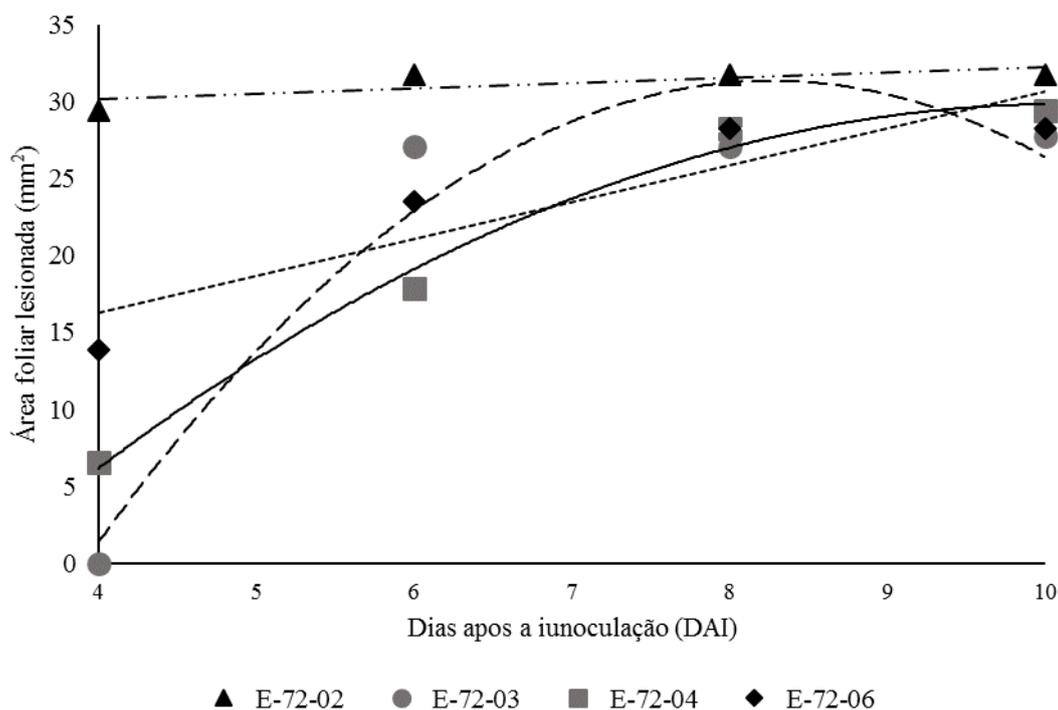
Não houve diferença estatística entre os isolados quanto a área foliar lesionada (AFL) por *P. microspora*, conforme Tabela 1. Após análises de regressão para o aumento das lesões nas folhas ao longo do tempo, os isolados E-72-02 e E-72-06 foram ajustados por um modelo linear, já os isolados E-72-03 e E-72-04 se ajustaram por um modelo polinomial de segundo grau. Todos os modelos foram significativos, entretanto com grande variação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ). O isolado E-72-02 foi superior aos demais quanto a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com média de 188,4. Os coeficientes de variação foram baixos, com valor de 16,07%, para AFL e, de 19,65, para AACPD.

**Tabela 1.** Área foliar de *Eucalyptus grandis* “GG100”, lesionada (AFL) por *Pestalotiopsis microspora* aos 10 dias após inoculação (DAI), modelos de regressão para aumento das lesões nas folhas e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) dos 4 aos 10 DAI.

Isolado	AFL aos 10 DAI (mm <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	Modelo de regressão	r <sup>2</sup> (%)	(P≤X)	AACPD <sup>(1)</sup>
E-72-02	31,8 a	Y = 0,3535x + 28,7263	60%	0,05	188,4 a
E-72-03	27,8 a	Y = -1,6483x <sup>2</sup> + 27,2446x - 81,2160	93,11%	0,01	136,1 b
E-72-04	29,4 a	Y = -0,6328x <sup>2</sup> + 12,8039x - 34,9112	99%	0,05	128,3 b
E-72-06	28,2 a	Y = 2,3900x + 6,7556	83,07%	0,05	145,7 b
Coefficiente de variação	16,07 %	-	-	-	19,65 %

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05).

De acordo com a (Figura 4), todos os isolados apresentaram crescimento das lesões a partir da primeira avaliação (4º dia). Porém, o comportamento dos isolados foram diferentes, sendo que os isolados E-72-02 e E-72-06 apresentaram crescimento contínuo e linear das lesões em todas as avaliações, tendência que não foi observada para os isolados E-72-03 e E-72-04, cujo pico de crescimento de lesão foi registrado aos 8 DAI.



**Figura 4.** Crescimento das lesões em (mm<sup>2</sup>) de *Pestalotiopsis microspora* a partir dos 4 até os 10 dias após inoculação (DAI) em folhas de *Eucalyptus grandis* “GG100”.

#### 4.2 Re-isolamento

Nesta avaliação, ao se comparar a média geral das metodologias empregadas, verificou-se que o re-isolamento de *P. microspora* pela obtenção de fragmentos de tecido vegetal sem desinfestação (SD) foi superior as demais metodologias quanto a obtenção de micélio de *P. microspora* nas placas de isolamento, uma vez que a média de AACCM para SD foi de 142,0 (Tabela 2). Em seguida, teve-se a metodologia por raspagem das lesões (R), com média de AACCM de 120,8 e por último a obtenção de colônias a partir de fragmentos de lesões desinfestados (D), com apenas 99,9 de AACCM. Já ao se comparar os isolados, através da média geral de AACCM, frente a todas a metodologias empregadas, os isolados E-72-02 e E-72-03 foram superiores aos demais (146,0 e 142,7, respectivamente), seguidos por E-72-04 (117,6 de AACCM) e por último, o isolado E-72-06, o qual apresentou menor média entre os quatro isolados avaliados (apenas 77,3 de AACCM).

**Tabela 2.** Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Pestalotiopsis microspora* após re-isolamento para meio BDA, mediante emprego de diferentes metodologias de recuperação de patogenicidade: Raspagem (R), Desinfestado (D) e Sem Desinfestação (SD)<sup>(1, 2)</sup>

Isolado	AACCM			Média
	R	D	SD	
E-72-02	166,2 aA	98,8 bB	173,0 aA	146,0 a
E-72-03	121,7 bB	128,3 aB	178,2 aA	142,7 a
E-72-04	116,3 bB	101,3 bB	135,3 bA	117,6 b
E-72-06	79,3 cA	71,1 cA	81,4 cA	77,3 c
Média	120,8 B	99,9 C	142,0 A	-
Coefficiente de variação	9,27 %	23,28 %	13,92 %	15,42 %

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>(2)</sup> R: Raspagem das lesões com agulha de platina; D: Desinfestação do tecido vegetal infectado em série desinfestadora, com posterior repicagem para meio BDA; SD: repicagem de tecido vegetal infectado diretamente para meio BDA (sem desinfestação).

### 4.3 Purificação e avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento

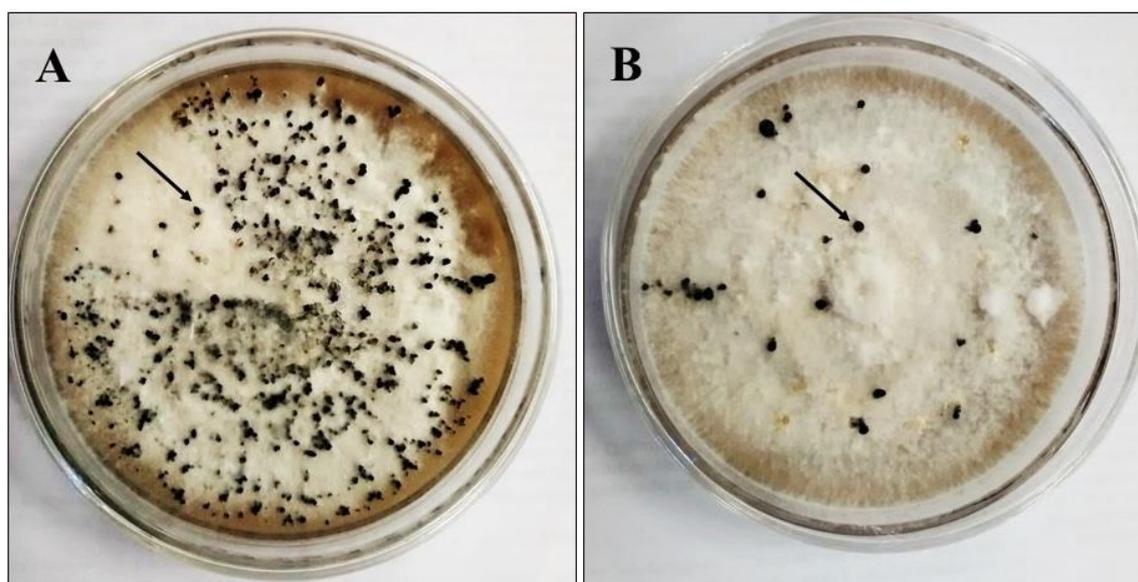
Na avaliação de esporulação dos isolados usando a metodologia de raspagem (R) para recuperação, verificou-se que o isolado E-72-06 foi superior aos demais quanto a esporulação, apresentando, em média,  $12,8 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  (Tabela 3; Figura 5). Nesta metodologia (R) isolados E-72-02 e E-72-04 apresentaram apenas  $0,2 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Já para a metodologia de desinfestação (D) o isolado E-72-03 foi superior aos demais, apresentando média de  $13,7 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , seguido pelo isolado E-72-04 ( $11,2 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), e por fim com menor índice de esporulação, mas não se diferenciando entre si, os isolados E-72-02 e E-72-06. Assim como na metodologia de (D), o isolado E-72-03 foi superior aos demais também na metodologia SD ( $16,6 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ).

**Tabela 3.** Número médio de conídios de *Pestalotiopsis microspora* por mL, após obtenção de colônias purificadas em meio BDA provenientes de três metodologias de recuperação de isolados: R, SD e D<sup>(1,2)</sup>

Isolado	Metodologia empregada para re-isolamento			Média
	R	D	SD	
E-72-02	0,2 cA	0,6 x 10 <sup>5</sup> cA	0,6 x 10 <sup>5</sup> cA	0,4 x 10 <sup>5</sup> d
E-72-03	9,2 x 10 <sup>5</sup> bC	13,7 x 10 <sup>5</sup> aB	16,6 x 10 <sup>5</sup> aA	13,2 x 10 <sup>5</sup> a
E-72-04	0,2 cB	11,2 x 10 <sup>5</sup> bA	0,2 cB	3,8 x 10 <sup>5</sup> c
E-72-06	12,8 x 10 <sup>5</sup> aC	1,6 x 10 <sup>5</sup> cA	7,0 x 10 <sup>5</sup> bB	7,4 x 10 <sup>5</sup> b
Média	5,6 x 10 <sup>5</sup> A	6,8 x 10 <sup>5</sup> A	6,1 x 10 <sup>5</sup> A	-
Coefficiente de variação	17,80 %	27,09 %	40,11%	31,43%

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>(2)</sup> R: Raspagem das lesões com agulha de platina; D: Desinfestação do tecido vegetal infectado em série desinfestadora, com posterior repicagem para meio BDA; SD: repicagem de tecido vegetal infectado diretamente para meio BDA (sem desinfestação).



**Figura 5.** Colônias de *Pestalotiopsis microspora* obtidas após re-isolamento. (A) isolado E-72-03, esporos obtidos pela metodologia que usou fragmentos de tecido vegetal lesionados sem desinfestação (SD). (B) isolado E-72-06, esporos obtidos pela raspagem das lesões com agulha de platina (R). Para ambos, as setas indicam as aglutinações escuras correspondentes ao desenvolvimento de acérvulo do fungo.

Em relação à média geral das metodologias de recuperação de esporulação, considerando-se todos os isolados avaliados, não houve diferença significativa entre estas, em que o valor médio variou de  $5,5 \times 10^5$  a  $6,8 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Já ao se avaliar a média de esporulação de cada isolado, quando submetido às três metodologias de recuperação, verificou-se que o isolado E-72-03 foi superior aos demais ( $13,2 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), seguido do isolado E-72-06 ( $7,4 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), em seguida, o isolado E-72-04 ( $3,7 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), e por fim com menor média de esporulação, o isolado E-72-02, com apenas  $0,4 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do potencial patogênico após longo período de armazenamento

No presente trabalho atenção foi dada primeiramente sobre a patogenicidade de cada isolado do fungo *Pestalotiopsis microspora* em folhas de eucalipto. Avaliações desta natureza já foram experimentadas por outros autores na cultura do eucalipto, entretanto utilizando outras espécies de *Pestalotiopsis* (ALONSO, et al., 2009; FARR e ROSSMAN, 2014). De acordo El-Argawy (2015), em testes de patogenicidade, com espécies de *Pestalotiopsis psidii*, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis neglecta*, *Pestalotiopsis clavispora* e *Pestalotiopsis* spp., causaram lesões em folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), uma planta frutífera tropical, com características similares às observadas no presente estudo, principalmente quanto ao tamanho das lesões, o qual variou entre 18,2 e 36,4 mm<sup>2</sup>. Ainda em estudo similar, Zangh et al. (2010) identificaram *P. microspora* ocorrente na planta ornamental *Hypericum patulum*, causando graves lesões na área foliar, porém com área lesionada de maior extensão do que no presente estudo, isto é, partindo de 20 mm<sup>2</sup> e, podendo chegar a 113 mm<sup>2</sup> de tamanho. Tal comportamento sugere que o tamanho de lesões causadas por *P. microspora* pode variar não só em função da população de patógeno encontrada, mas também em função do tipo de hospedeiro. Ademais, o fato de não existir diferença entre os isolados de *P. microspora* do presente estudo (E-72-02; E-72-03; E-72-04; E-72-06) quanto ao tamanho da área foliar lesionada, pode estar relacionado com a natureza de obtenção destes, ou seja, o fato de pertencerem a uma mesma população e, portanto, descendentes de um ancestral comum (JEEWON et al., 2002).

Embora não tenha havido diferença estatística quanto ao tamanho das lesões provocadas, após análises de regressão para o aumento das lesões nas folhas ao longo do tempo, os isolados E-72-02 e E-72-06 se comportaram de maneira diferente dos isolados E-72-03 e E-72-04. Tal evento evidencia diferentes comportamentos quanto ao crescimento e evolução das lesões entre isolados de uma mesma espécie de *Pestalotiopsis* (KEITH et al., 2006). Segundo Grosopo (2005), dentro de um mesmo grupo pode existir organismos com características diferentes e, isso ocorre devido ao meio ambiente ou por mutações.

Sintomas evidenciando o aparecimento das lesões em condições de inoculação,

foram visíveis a partir do 4º dia da inoculação. Esses sintomas consistiram por lesões necróticas de coloração marrom escura, com posterior aglutinação de esporos de coloração negra, com tamanho variado de 27 a 31 mm<sup>2</sup> aos 10 DAI. O rápido surgimento dos sintomas aos 4 DAI observado para os isolados E-72-02 e E-72-06 pode-se configurar em resultado não muito usual, visto que Lazarotto et al. (2014), ao realizar inoculação em dez isolados de *Pestalotiopsis* spp. por meio de suspensão de esporos nas folhas de Pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch), só observou os primeiros sintomas aos 13 DAI. Excelente performance inicial verificada para E-72-02 e E-72-06 pode ser explicada pelo fato de que, apesar de espécies de fungos do gênero *Pestalotiopsis* serem considerados como patógenos fracos, quando existem áreas previamente feridas no limbo foliar (como foi o caso da inoculação artificial do presente trabalho), o rápido crescimento do patógeno é favorecido (CARDOSO et al., 2003), sugerindo que este fungo se trata de um patógeno oportunista. Contudo, *P. microspora* tem sido relatado em vários hospedeiros, com diferentes comportamentos patogênicos, onde acredita-se que estudos direcionados ao comportamento patogênico de diferentes espécies e isolados de *Pestalotiopsis* devem ser conduzidos de modo a auxiliar o entendimento sobre não só o seu poder patogênico, mas o comportamento de sua patogenicidade.

Um menor valor do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) observado para E-72-02 e E-72-06 em relação aos demais, pode estar relacionado a diversidade dos isolados, diferenciando-os entre mais e menos agressivos inicialmente (OLIVEIRA et al., 2011), pois as condições de incubação foram uniformes para todos, o que supostamente acarretaria na igualdade de comportamento, entretanto, a partir do nono dia os isolados E-72-02 e E-72-06 continuam com crescimento contínuo das lesões, o que não ocorre com E-72-03 e E-72-04, isto indica a complexidade dos isolados estudados. Estudos sobre variação na patogenicidade de isolados fúngicos têm sido observados com frequência, sendo amplamente discutido por diversos autores, devido à virulência do isolado, à especificidade e à tolerância do hospedeiro e a consequência da variabilidade genética de cada isolado em estudo (ROHDE et al., 2006; CARNEIRO et al., 2008; KAUR e PADMAJA, 2008). Isto mostra que há abertura para a inclusão de novos estudos sobre patogenicidade de *P. microspora*.

A partir dos dados de severidade da doença, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), onde observou-se que a AACPD para o isolado E-

72-02 foi maior em relação aos demais. Uma explicação para tal evento reside na rápida colonização inicial do parênquima foliar efetuada por E-72-02, visto que já aos 4 DAI, área média de lesão próximo de 30 mm<sup>2</sup> já foi verificada para este isolado.

## 5.2 Re-isolamento

Após se avaliar as três metodologias de isolamento: raspagem das lesões com agulha de platina (R), obtenção de micélio pelo emprego de fragmentos de tecido vegetal lesionados sem desinfestação (SD) e obtenção de micélio pelo emprego de fragmentos de tecido vegetal lesionados desinfestados (D), verificou-se que (SD) foi superior as demais metodologias quanto a obtenção de micélio de *P. microspora* nas placas de isolamento. Tal leitura foi possível ao se integralizar o crescimento micelial em todas as datas de avaliação e consequente obtenção da área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM), a qual tem sido utilizada para comparar o crescimento micelial entre diferentes isolados de fungos ou tratamentos (MEDEIROS et al., 2006; VIANA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2012).

O melhor desempenho da metodologia (SD) pode ser explicado pela particularidade da técnica, a qual previne o contato do material vegetal infectado com agentes desinfestadores, os quais, além de remover eventuais contaminantes, podem também, indevidamente, atingir o fungo-alvo (BUENO et al., 2007; COUTO et al., 2013). Além disso, como as inoculações e os testes de patogenicidade foram conduzidos em condições rigorosamente assépticas, a ausência de desinfestação do material vegetal lesionado não proporcionou contaminações nas placas de Petri, ou mesmo quando da rara ocorrência de tal fato, eventuais placas contaminadas, foram descartadas.

Por outro lado, o crescimento micelial após emprego da técnica de desinfestação (D), foi prejudicado devido ao uso das substâncias químicas empregadas na série desinfestadora dos fragmentos. Finalmente, considerando-se as duas técnicas extremas (SD e D), como era esperado, o crescimento micelial de *P. microspora* obtido por raspagem de lesões (R), ocupou posição intermediária nas análises estatísticas. Além disso, os baixos valores dos coeficientes de variação (%) encontrados para AACCM, demonstram precisão e confiabilidade dos dados obtidos.

Já ao se comparar os isolados, através da média geral de AACCM, frente a todas as metodologias empregadas, os isolados E-72-02 e E-72-03 foram superiores aos

demais. Para tanto, uma explicação pode ser creditada a variabilidade genética dos isolados, os quais possuíram distintos comportamentos frente a cada técnica. De maneira geral, pode-se afirmar que estes dois isolados mencionados responderiam bem ao emprego de qualquer técnica de isolamento. De fato, como era esperado, a AACCM consiste em uma variável útil na separação de isolados (LAZAROTTO, et al., 2014). Ademais, é importante registrar que as metodologias testadas (R, SD e D) atenderam uma exigência citada como importante por Aparecido et al. (2001), que é manter as características originais dos fitopatógenos, tais como patogenicidade, crescimento das colônias e esporulação.

### **5.3 Purificação e avaliação de esporulação dos isolados após re-isolamento**

A indiferença quanto a esporulação frente às diferentes metodologias de isolamento empregadas reside no fato de que nem sempre as condições que favorecem o crescimento micelial do fungo são as mesmas para esporulação, isto é, os fatores de desinfestação que inibiram a AACCM não prejudicaram a esporulação (NOZAKI et al., 2004). Além disso, os mecanismos que potencializam a esporulação de fungos assexuais Hyphomycetes, são distintos das técnicas avaliadas no presente trabalho, as quais visavam a recuperação de patogenicidade e de crescimento micelial (CARVALHO et al., 2008).

Ao contrário do que foi observado para a esporulação frente as técnicas de isolamento, houve diferença entre os isolados quanto a esporulação. A diferença na esporulação de isolados de uma mesma espécie de *Pestalotiopsis* já foi observada em vários estudos (CHEN et al., 2013; REN, et al., 2013; LAZAROTTO, et al., 2014). Segundo Carvalho et al. (2008), a esporulação é uma característica isolado-dependente, a qual pode estar relacionada a diversos fatores, tais como influência das repicagens, virulência do patógeno e reação deste a fatores físicos indutores de esporulação a exemplo de luz contínua.

Finalmente, no presente estudo, atenção especial deve ser dada ao isolado E-72-03, o qual apresentou bom desempenho no teste de patogenicidade, no crescimento micelial após re-isolamento e quanto a capacidade de esporulação. Embora condições de laboratório não possam simular perfeitamente as condições do ambiente natural (KEITH, et al., 2006), a reação de isolados de fitopatógenos a diferentes fatores físicos,

de cultivo *in vitro* ou quanto ao poder de patogenicidade fornecem subsídios para estudos relacionados a epidemiologia das doenças por estes provocadas em condições de campo (TERAMOTO et al., 2013).

## 6 CONCLUSÕES

- 1 - A área foliar lesionada não variou entre os isolados de *P. microspora* aos 10 DAI, entretanto, o isolado E-72-02 foi superior aos demais quanto à AACPD, tendo em vista seu maior poder patogênico aos 4 DAI.
- 2 - Maior valor de AACCM para a metodologia que empregou tecidos vegetais lesionados sem desinfestação (SD) em relação às demais, evidencia a sensibilidade de *P. microspora* à agentes desinfestadores.
- 3 - Os agentes desinfestadores que inibiram a AACCM após isolamento via emprego de tecidos vegetais lesionados desinfestados (D) não prejudicaram a esporulação dos isolados, a qual foi indiferente à técnica de re-isolamento empregada.
- 4 - Ao final do emprego de diferentes técnicas de re-isolamento, a ocorrência de diferença entre os isolados quanto a esporulação, evidencia que esta é uma característica isolado-dependente.
- 5 - As três técnicas avaliadas (R, SD e D) permitem a recuperação da esporulação de *P. microspora* após estes terem sido submetidos a longo período de armazenamento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.A.L. **O setor brasileiro de árvores plantadas**. IBÁ - Instituto Brasileiro de Árvores Plantadas. Capítulo 2. 2015. 80p.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 2009. 500p.
- ALONSO, R.; TISCORNIA, S.; ALFENAS, A.C.; BETTUCCI, L. Fungi associated to bark 411 lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.591-597, 2009.
- ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno Manual Sobre Fungos Entomopatogênicos**. Brasília: Embrapa Cerrados. Documentos, 286. 2010. 50p.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQUE. 1998. 1163p
- ANGELI, A. **Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus***. Supervisão: BARRICHELO, L.E.G.; MULLER, P.H. IPEF. 2005. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/eucalyptus/indicacoes>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A.P.M.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.4, p.421-424, 2001.
- BERNARDI, C.O.M.; MACEDO, H.R.; BONILHA PINHEIRO, R.S.; FREITAS, M.L.M. Florestas plantadas de eucalipto em sistemas silvipastoris e o impacto da entrada do componente animal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.9, n.5, p.125-132, 2014.
- BUENO, C.J.; AMBRÓSIO, M.M. DE Q.; SOUZA, N.L. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em microcosmo simulando solarização com prévia incorporação de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.). **Summa Phytopathologica**, v.30, n.3, p.356-363, 2004.
- BUENO, J.C.; AMBRÓSIO, M.M.Q; DE SOUZA, N.L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopatológica**, v.33, n.1, p.47-55, 2007.
- CAMPOS, D.T.S.; SILVA, M.C.S.; LUZ, J.M.R. da; TELESFORA, R.J.; KASUYA, M.C.M. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.965-974, 2011.
- CARDOSO, G.D.; BARRETO, A.F.; ARAÚJO, E.; ALMEIDA, F.A.; CARVALHO, R.A.G. Etiologia e progresso da mancha de Pestalotiopsis do coqueiro (*Cocos nucifera*), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.335-336, 2003.
- CARMO, A.L.M.; GARCIA, F.A.O.; PERES, F.S.B. Ocorrência de minicancro em *Eucalyptus viminalis* Labill no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.1634, 2013.

CARNEGIE A.J.; LIDBETTER J.R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.41, n.1, p.13-29, 2012.

CARNEIRO, A.A.; GOMES, E.A.; GUIMARÃES, C.T; FERNANDES, F.T.; CARNEIRO, N.P.; CRUZ, I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.4, p.513-520, 2008.

CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; BATISTA, T.R.S.; CAMARGOS, R.B.; LOPES, E. A.G.L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.4, p.792-798, 2008.

CHEN, F.; LU, L.; WANG, D.; WANG, Y.; NI, H.; DU, Z. Biological characterization and genetic diversity analysis of two species of *Pestalotiopsis* causing twig dieback of *Myrica rubra*. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.4, p.737-747, 2013.

COSTA, E.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; ARAUJO, S.A. C.; ROLIM, B.N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v.19, n.2, p.111-122, 2009.

COUTO, F.A.; MONTEIRO, M.C.P.; DA SILVA, D.M.; CIRILLO, M.A.; BATISTA, L.R. Biodiversidade de fungos filamentosos em grãos de café cultivados em sistema orgânico e convencional. **Coffee Science**, v.8, n.2, p.132-139, 2013.

EL-ARGAWY, E. Characterization and control of *Pestalotiopsis* spp. the causal fungus of guava scabby canker in el-beheira governorate, Egypt. **International Journal of Phytopathology**, v.4, n.3, p.121-136, 2015.

ESPINOZA, J.G; BRACEÑO, E.X. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and *Truncatella* sp. In Chile. **Plant Disease**, v.92, n.10, p.1407-1414, 2008.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and 450 Microbiology Laboratory**, ARS, USDA, 2014. Disponível em: <http://nt.ars-451.grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 05 de abril de 2016.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; MAFIA, R.G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.468-475. 2006.

FURTADO, E. L.; SANTOS, C.D.; TAKAHASHI, S.; CAMARGO, F.D. **Doenças em viveiro de *Eucalyptus* sp.: diagnóstico e manejo**. Botucatu: Votorantim Celulose e Papel, Unidade Florestal. Boletim Técnico, 1. 2001. 23p.

GEZAHGNE, A.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.J. Diseases of exotic *Eucalyptus* and *Pinus* species in Ethiopian plantations. **South African Journal of Science**, v.99, p.29-33, 2003.

GIRÃO, M.D.; PRADO, M.R.D.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.3, p.229-233, 2004.

GONÇALVES, R.C.; ANDRADE, C.M.S.; DE SÁ, C.P.; MARCOLINO E.F. et al. **Produção de sementes de de *Arachis pintoi* cv, BRS Mandobi no Acre**. Embrapa Acre. Circular Técnica, 4. 2011. 15p.

GONTHIER, P.; MASSIMO, G.; NICOLOTTI, G. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. **Fungal Diversity**, v.21, n.6, p-69-80, 2006.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; BIZI, R.M.; AUER, C.G. **Metodologia para inoculação padronizada de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus dunnii***. Colombo: Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 134. 2005. 2p.

GROSOPO, J.G.S. ***Phellinus quélet* (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) no sul do Brasil: uma abordagem filogenética**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina - Dissertação de mestrado em Biologia Vegetal. 2005. 159p.

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera Inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, n.3, p.378-392, 2002

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, v.17, p.39- 55, 2004.

JOSHI, S.D.; SANJAY, D.; BABY, U.I; ANDAL, A.K.A. Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in Southern India using RAPD and ISSR markes. **Indian Journal of Biotechnology**, v.8, n.4, p.377-383, 2009.

KARAKAYA, A. First report of Infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. In Turkey. **Plant Disease**, v.85, p.1028. 2001.

KAUR, G.; PADMAJA, V. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, n.11, p.299-307, 2008.

KEITH, L.M.; VELASQUEZ, M.E.; ZEE, F.T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava* , in Hawaii. **Plant Disease**, v.90, n.1, p.16-23, 2006.

KHARWAR, R.N.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and 478 their antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1941-1948, 2010.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual**

**de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.36, p.319-332.

KRUSCHEWSKY, M.C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a mata atlântica do sul da Bahia.** Itabuna: Universidade Estadual de Santa Cruz - Dissertação de mestrado em Produção Vegetal. 2010. 68p.

LANA, V.M.; MAFIA, R.G.; FERREIRA, M.A.; SARTÓRIO, R.C.; ZAUZA, E.A.V.; MOUNTEER, A.H.; ALFENAS, A.C. Survival and dispersal of *Puccinia psidii* spores in *eucalypt* wood products. **Australasian Plant Pathology**, v.41, n.3, p.229-238. 2012.

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M.P.; MUNIZ, M.F.B.; HARAKAWA, R.; REINIGER, L.R.S.; SANTOS, A.F. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.6, p.440-448, 2014.

MARQUES, M.G.; MILLAN, M.D.; SILVA, L.R.; CARVALHO, D.D.C. Caracterização fisiológica de isolados de *Pestalotiopsis* sp. em eucalipto. In: II CONGRESSO DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG, v.2, 2015. Pirenópolis, Goiás.

MARTIN, B.; COSSALTER, C. Les *Eucalyptus* des Iles de la Sonde. **Bois Et Forêts Des Tropiques**, n.164, p.3-25, 1976.

MEDEIROS, E.V.; JÚNIOR, R.S.; MICHEREFF, S.J. Eficiência de fungicidas no controle “in vitro” de *Monosporascus cannonballus*. **Revista Caatinga**, v.19, n.4, p.360-368, 2006.

MEDEIROS, E.V.; VIANA, M.G.; DE ALBUQUERQUE, C.C. Extrato etanólico de *Senna alata* no controle de *Fusarium oxysporum*, causador da murcha-de-fusarium do meloeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.11, p.1166-1170, 2012.

MILAN, M.D.; BARROSO, F.M.; MELLO, S.C.M.; ARAÚJO, M.S.; CARVALHO, D.D.C. Regimes de luz na produção de conídios de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, n.4, p.434-439, 2015.

NAG RAG, T.R. **Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia.** Mycologue Publications. Waterloo, Ontario, Canada. 1993.1101p.

NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G. Desinfestação e Germinação in vitro de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.141-143, 2007.

NEVES, T.A.; PROTÁSIO, T. de P.; TRUGILHO, P.F.; VALLE, M.L.A.; SOUSA, L. C.; VIEIRA, C.M.M. Qualidade da madeira de clones de *Eucalyptus* em diferentes idades para a produção de bioenergia. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.56, n.2, p.139-148, 2013.

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.429-432, 2004.

OLIVEIRA, T.N.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; MELLO, A.C.L.; FERREIRA, R.L.C.; LIRA JÚNIOR, M.A.; SILVA, N.G.M. 2011. Estimativa de coeficientes de repetibilidade para mancha ocular em clones de *Pennisetum*. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.231, p.797-808, 2011.

PAOLI, P. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.897-910, 2005.

PASSADOR, M.M.; PIRES, G.C.C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, v.72, n.1, p.51-55, 2010.

PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; JUNIOR, A.G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v.36, n.1, p.123-128, 2006.

PLOETZ, R.C. Diseases of atemoya, cherimoya, sour sop. Sugar apple and related fruit crops. **Disease of Tropical Fruit Crops**, p-21-34, 2003.

POLIZZI, G.; VITALE, A.; AIELLO, D.; GUARNACCIA, V.; CROUS, P.; LOMBARD, L. First report of *Calonectria ilicicola* causing a new disease on *Laurus* (*Laurus nobilis*) in Europe. **Journal of Phytopathology**, v.160, n.1, p.41-44, 2011.

PRYOR, L.D. **The Biology of eucaliptos**. London: Institute of Biology. 1978. 82p.

REN, H.Y.; LI, G.; LIANG, S.; YANG, G.; ZHENG, X.; WEI, J.; QI, X. Effects of culture media, carbon and nitrogen sources and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Pestalotiopsis microspora* strains, the agent of bayberry twig blight in southern China. **Asia Life Sciences**, v.22, n.2, p.713-727, 2013.

RODAS, C.A.; LOMBARD, L.; GRYZENHOUT, M.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. *Cylindrocladium* blight of *Eucalyptus grandis* in Colombia. **Australasian Plant Pathology**, v.34, p.143-149, 2005.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.R.L.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.35, n.2, p.231-240, 2006.

ROSA, R.C.T.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Queda de folíolos em *Parkia pendula* causada por *Pestalotiopsis* sp. no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.6, p.672-676, 2005.

ROYO, J. **Doenças reduzem em até 60% produção de eucalipto**. 2012. Disponível em:

<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=24158&secao=Pacotes%20Tecnol%F3gicos>. Acesso em 25 de janeiro de 2016.

SANTOS, A.F.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas. Circular Técnica, 45. 2001. 20p.

SMITH, G.J.D.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. The Xylariales : a monophyletic order containing 7 families. **Fungal Diversity**, v.13, p.85-218, 2003.

SOLA, M.C.; DE OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p.1398-1418, 2012.

STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2001. 484p.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.491- 502, 2003.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervular and Stromata**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 1980. p. 696.

TERAMOTO, A.; PARISI, M.C.M.; CUNHA, M.G. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.4, p.313-322, 2013.

VIANA, M.G.; ALBUQUERQUE, C.C.D.; MEDEIROS, E.V.D.; VIANA, F.A.; SILVA, K. M.B. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosparacus cannonballus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1387-1393, 2008.

WEI, J.G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. **Fungal Diversity**, v.15, p.247-254, 2004.

XAVIER, S.A.; DE MELLO, F.E.; CANTERI, M.G.; GODOY, C.V. Fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Corynespora cassiicola* e *Erysiphe difusa*. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.2, p.156-159, 2015.

ZHANG, M.; WU, H.Y.; TSUKIBOSHI, T.; OKABE, I. First Report of *Pestalotiopsis microspora* Causing Leaf Spot of Hidcote (*Hypericum patulum*) in Japan. **Plant Disease**, v.94, n.8, p.1064, 2010.